

证 明

REC'D 10 SEP 2003	
WIPO	PCT

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2002 08 02

申 请 号： 02 1 25917.8

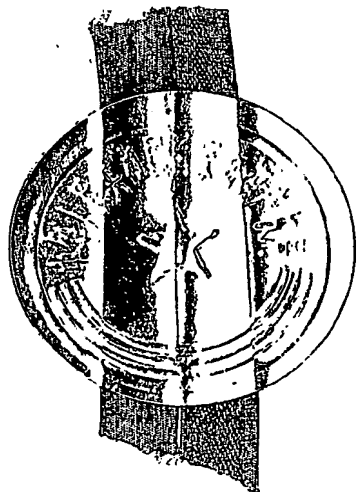
申 请 类 别： 发明

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

发明创造名称： 核黄素衍生物及其制备方法与应用

申 请 人： 中国人民解放军军事医学科学院放射医学研究所

发明人或设计人： 徐琪寿； 王林； 童朝阳； 郭长江； 恽榴红



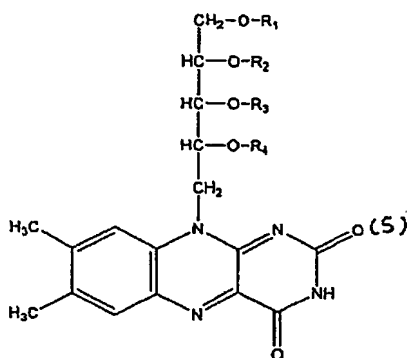
中华人民共和国
国家知识产权局局长

王景川

2003 年 8 月 12 日

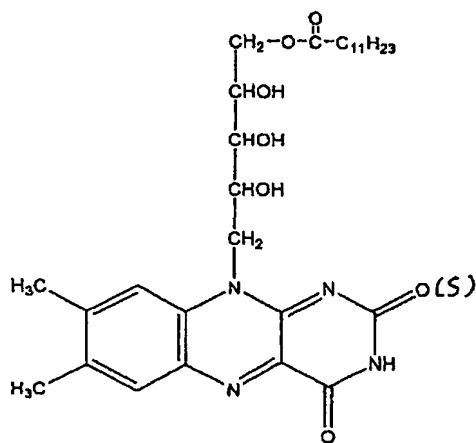
权 利 要 求 书

1. 核黄素或硫代核黄素侧链核糖醇羟基上的酯及醚类衍生物，其中除核黄素四硬脂酸酯、四棕榈酸酯、三月桂酸酯、四癸酸酯、四丁酸酯、四乙酸酯、色氨酸四酯、核黄素磷酸酯等化合物，所有在体内可以释放为核黄素醇羟基上的酯类衍生物，用于提高核黄素生物利用度均属本权利要求范围。
2. 式(I)化合物 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 可不同或相同及独立存在的单酯、双酯、三酯、四酯等核黄素酯类衍生物。



式(I)

3. 式(II)化合物 R_1 为月桂酰基， R_2 、 R_3 、 R_4 为 H，形成的核黄素-5'-月桂酸单酯为本发明创新一类新药保护的目标化合物，所述化合物其结构为：



式(II)

4、一种合成权利要求 3 所述化合物的方法，是在催化剂存在的条件下，向悬浮于极性有机溶剂中的核黄素或硫代核黄素中，滴加溶于极性有机溶剂中的月桂酰氯。

5、根据权利要求 4 所述的方法，其特征在于：所述悬浮核黄素或硫代核黄素的极性有机溶剂为吡啶或二甲基甲酰胺；溶解月桂酰氯的极性有机溶剂为二氧六环或二甲基甲酰胺；所述催化剂为有机胺类溶剂，其中优选的是三乙胺。

6、一种以权利要求 3 所述化合物为活性成分的油混悬制剂，基本上由式(II)化合物、山茶油和油酸乙酯组成。

7、根据权利要求 6 所述的油混悬制剂，其特征在于：所述各组分的重量(体积)份数比为：

式(II)化合物	50—150 毫克
山茶油	0.3-0.6 毫升
油酸乙酯	0.3-0.6 毫升

8、根据权利要求 7 所述的油混悬制剂，其特征在于：所述各组分的重量(体积)份数比为：

式(II)化合物	150 毫克
山茶油	0.5 毫升
油酸乙酯	0.5 毫升

9、权利要求 1-3 任意一项所述化合物在制备治疗核黄素缺乏症的药物中的应用。

10、权利要求 1-3 任意一项所述化合物在制备治疗肿瘤化疗及放疗所引起的消化道粘膜炎的药物中的应用。

11、权利要求 1-3 任意一项所述化合物在制备治疗冠心病、高血压并发症、关节炎、烧伤的药物中的应用。

说明书

核黄素衍生物及其制备方法与应用

技术领域

本发明涉及核黄素衍生物及其制备方法与应用。

背景技术

核黄素是黄素酶辅基的组成部分，参与机体复杂的氧化过程，具有重要的药理学作用。近些年来药理学研究表明，除治疗传统的核黄素缺乏病外，核黄素还具有治疗冠心病、高血压并发症、烧伤等方面的药理作用。但核黄素是水溶性维生素，易从汗液及尿中排除体外，半衰期短，生物利用度低。因此，当核黄素摄入不足或需要量增加时极易引起唇炎、口角炎、舌炎、阴囊皮炎等统称为口腔生殖器综合症，以及影响视力的结膜炎和球膜炎等各种核黄素缺乏症。长期以来，为防治各种原因引起的核黄素缺乏病，对核黄素衍生物进行了大量的研究，希望能找到一种合适的核黄素衍生物作为药物前提体，在体内缓慢释放出核黄素原形，达到一次用药能较长时间在体内贮留，发挥药效的目的。日本学者 Kunio、宫本等用核黄素与脂肪酸酰氯或酸酐在吡啶中作用合成了核黄素四棕榈酸，四癸酸酯，四丁酸酯及四乙酸酯、色氨酸四酯，但这些酯在唾液及小肠液均不能水解，对四棕榈酸酯的进一步研究表明它没有核黄素的生物活性。

本研究试图通过改变化学结构，引入长效基团及采用药剂学方法增加核黄素在体内贮留，使其能增加吸收、延缓排泄，提高生物利用度，达到长效的目的。经对核黄素的酯、醚、酮、胺、腈、肼、硫代和芳烃及其杂环取代物以及金属盐类等 298 个化合物的构效关系研究，确定了在核黄素侧链核糖醇羟基偶联脂肪酸成酯作为长效核黄素的发展方向，通过对碳链长度的优化，从中筛选获得核黄素月桂酸酯，并制成了长效核黄素油混悬注射液制剂，一次肌肉注射 150mg/ml，长效三个月，为防治常见的核黄素缺乏病提供了一种重要的药物疗法。

此外，本研究还发现长效核黄素制剂可用于白血病行骨髓移植和抗肿瘤化疗、放疗中所引起的各种皮炎、口腔与消化道粘膜炎都获得了满意的效果，提高了临床病人化疗、放疗的耐受力，显示了很好的辅助治疗效果。

发明内容

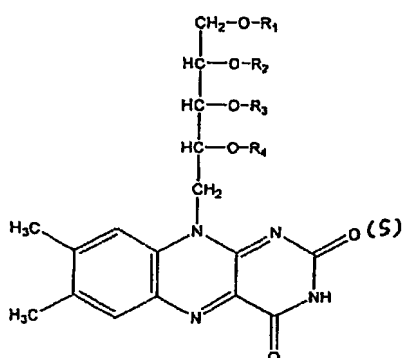
本发明的目的是提供一种新型的核黄素衍生物。

本发明的第二个目的是提供一种以本发明化合物为活性成分的核黄素长效制剂

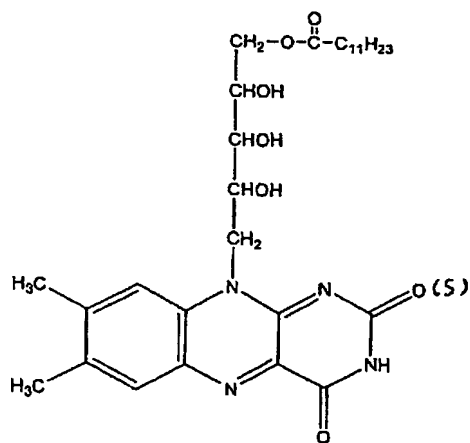
本发明的技术方案是：

核黄素或硫代核黄素侧链核糖醇羟基上的酯及醚类衍生物，其中除核黄素四硬脂酸酯、四棕榈酸酯、三月桂酸酯、四癸酸酯、四丁酸酯、四乙酸酯、色氨酸四酯、核黄素磷酸酯等化合物，所有在体内可以释放为核黄素醇羟基上的酯类衍生物，用于提高核黄素生物利用度均属本权利要求范围。

式(I)化合物 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 可不同或相同及独立存在的单酯、双酯、三酯、四酯等核黄素酯类衍生物。



式(II)化合物 R_1 为月桂酰基， R_2 、 R_3 、 R_4 为 H，形成的核黄素-5'-月桂酸单酯为本发明创新一类新药保护的目标化合物，所述化合物其结构为：



式(II)

一种合成权利要求 3 所述化合物的方法，是在催化剂存在的条件下，向悬浮于极性有机溶剂中的核黄素或硫代核黄素中，滴加溶于极性有机溶剂中的月桂酰氯。

所述悬浮核黄素或硫代核黄素的极性有机溶剂为吡啶或二甲基甲酰胺；溶解月桂酰氯的极性有机溶剂为二氧六环或二甲基甲酰胺；所述催化剂为有机胺类溶剂，其中优选的是三乙胺。

一种以权利要求 3 所述化合物为活性成分的油混悬制剂，基本上由式(II)化合物、山茶油和油酸乙酯组成。

所述各组分的重量（体积）份数比为：

式(II)化合物	50—150 毫克
山茶油	0.3-0.6 毫升
油酸乙酯	0.3-0.6 毫升

所述各组分的重量（体积）份数比为：

式(II)化合物	150 毫克
山茶油	0.5 毫升
油酸乙酯	0.5 毫升

本发明化合物在制备治疗核黄素缺乏症的药物，制备治疗肿瘤化疗及放疗所引起的消化道粘膜炎的中的应用，制备治疗冠心病、高血压并发症、关节炎、烧伤的药物中将得到广泛应用。

通过核黄素的构效关系及作用机制的研究，还发现长效核黄素-5'-月桂酸酯是产量最高，效果最好的一个化合物，经四大光谱分析包括二维超导核磁分析证明，是一种结构清楚，全新的核黄素衍生物。

附图说明

图 1 为长效核黄素对大鼠体重的影响

具体实施方式

实施例 1：核黄素-2,6-二甲氧基苯甲酸酯的制备

取核黄素 5g，2,6-二甲氧基苯甲酰氯 11g，投入三角瓶中，加热搅拌在 80-90℃ 反应 1 小时，冷却下加入 10ml 甲醇，倒入 2L 水中析出黄色结晶，过滤，水洗，干燥，约定 11.4g 粗品。粗品溶于 80ml 吡啶中过滤，滤液倒入 2L 水中析出结晶，过滤干燥，得 7.8 g。所得化合物的 mp 162-166℃ 元素分析，计算值 (%) : C61.6, H5.09, N5.42；实测值 C61.41, H5.24, N6.29。

实施例 2：核黄素-异丁酸酯的制备

将核黄素悬浮于-异丁酸酐中，室温滴加过氯酸，加毕继续搅拌反应堆 7 小时，反应液呈透明紫红色，加乙醚沉淀，析出结晶，过滤，然后用 30ml 正丁醇溶解结

再用水多次洗涤正丁醇，干燥，加入乙醚析出结晶，过滤，真空干燥，过滤得产品。所得化合物的 mp 165-169℃ 元素分析，计算值(%) N8.41；实测值 N8.32。

实施例 3：核黄素-金刚烷酸酯的制备

在制备有金刚烷酸酰氯的反应瓶中，加入核黄素 1g，吡啶 20ml，搅拌下慢慢加热至回流，核黄素逐渐全溶，再继续回流 2 小时，冷却过夜，过滤，以除去未反应的部分核黄素，将滤液减压蒸馏除去吡啶，残渣用甲醇溶解，加活性碳回流脱色过滤，滤液倒入水中即析出结晶，冷却过滤，得粗品，将粗品用少量甲醇溶解，冷冻结晶析出，过滤，干燥。所得化合物的 mp 118-120℃ 元素分析，计算值(%) : C71.4, H7.42, N5.46；实测值 C65.52, H7.20, N5.45。

实施例 4：核黄素-5'-月桂酸单酯的化学合成与制备分离

取吡啶 1200ml，蒸馏水 1200ml 和三乙胺 120ml 混合，外用冰浴使内温保持 5-10℃，加入核黄素 25.0g，电磁搅拌至原料基本溶解。滴加月桂酰氯和二氧六环 270ml 组成的混合溶液，保持内温 10℃，于 25min 滴完，搅拌 20min。外用冰盐浴使内温降至 5℃，滴加预先配制的浓硫酸 400ml 和蒸馏水 600ml 组成的溶液，控制内温 10-15℃，于 45min 滴完。再将内溶物至冰水中 2.5h，溶液 PH 约为 6。过滤，用水 100ml×2 洗涤，压干。用乙醚 200ml×4 洗涤，弃去洗涤液，将固体凉干，过滤凉干得反应产物粗品 22.5g，用浓盐酸溶解，过滤，加入 50%乙醇，放置过夜。过滤得核黄素原料，凉干重 20.5g，回收率 82%。将混合溶剂母液于 35℃减压抽干，得红色固体。将固体依此用乙醚、二氯甲烷 100ml×5，甲醇 50ml×5 洗涤，凉干压碎，置五氧化二磷干燥器 48h，得 2.60g 红色固体，产率 38.9%(按回收原料计算)，为核黄素单酯粗品。

取 100-200 目粗孔硅胶 550g，干法装柱，将核黄素单酯粗品 10.45g，用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}(95:5)$ 500ml 浸泡，取上清液上柱，再以同一混合溶剂 500ml 浸泡与过柱，如此重复至全溶，再继续用该溶剂流动相洗脱。收集流出液，共 20 份，每份 500ml。按流出顺序编号(1)-(20)号。TLC 分析表明，(1)-(2)中含单酯及少量多酯；(3)-(16)基本为单酯；(17)-(20)单酯量极少，无其它成份。将(3)-(20)合并，于外温 25-30℃水压回收溶剂，得红色固体 4.08g，依次以 Et_2O 400ml $\text{Et}_2\text{O}:\text{CH}_2\text{Cl}_2(4:1)$ 各 400ml，浸泡 8h，再过滤，置 P_2O_5 干燥器中干燥过夜，得 3.00g 红色固体。按类似方法处理，从(1)-(2)中分离单酯纯品 0.24g，共得 3.24g，分离产率 31.0%。

所得单酯纯品用 HPLC、 C_{18} 柱，97%甲醇：3%水为流动相，为单一色谱峰。化合物

C62.08, H7.74, N9.68。比旋度 $[\alpha]^{25} = -8.4$ (C0.5, $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ 1:1)。

UV(max, CH_3OH) 225.8 nm, 269.2nm, 361.4nm, 444.2nm. IR(cm^{-1}), 3420(br, 2 OH),

3178(OH), 1728(br, 2 C=O), 1661(C=O)。MS(m/Z) 分子离子峰与目标化合物分子量相同。 $^1\text{H-NMR}(\text{C}_5\text{D}_5\text{N})$, δ (ppm), 8.19(s, 1 H, Ar), 7.89(s, 1 H, Ar), 5.55(m, 1

H, HOCH), 5.35(m, 2H, OCH_2), 5.10(m, 1 H, HOCH), 4.90(m, 2 H, NCH_2), 4.60(br, 1 H, HOCH),

2.31(t, 2 H, COCH_2), 1.4(s, 3 H, ArCH_3), 2.15(s, 3 H, ArCH_3), 1.59(m, 2 H, CH_2CH_2), 0.83(t, 3 H, CH_2CH_2)。 $^{13}\text{C-NMR}(\text{C}_5\text{D}_5\text{N})$, δ

(ppm), 173.9(C=O), 160.91(C), 159.9(C), 146.6(C),

137.6(C), 136.2(C), 135.0(C), 133.0(C), 131.7(CH), 118.1(CH), 71.5(CH), 71.3(CH),

70.9(CH); 67.6(CH_2), 49.0(CH_2), 48.99(CH_2), 32.1(CH_2), 29.8(CH_2), 29.7(CH_2),

29.5(CH_2), 29.4(CH_2), 25.3(CH_2), 22.9(CH_2), 20.8(CH_2), 19.8(CH_3), 14.4(CH_3)。

实施例 5: 长效核黄素的长效作用

Wistar 雄性大鼠 60 头, 体重 $64.5 \pm 4.6\text{g}$, 单笼喂养于代谢笼。试验前喂养正常 AIN-76 饲料一周, 按体重随机分成 6 组, 即正常对照组、核黄素对照组、长效核黄素单酯低、中、高剂量组, 试验期间喂养不含核黄素 AIN-76 饲料, 自由饮用自来水, 每天记录摄食量, 每隔 6 天称取体重一次。长效核黄素单酯油混悬制剂(75mg/ml), 一次性注射于动物右后腿肌肉内, 注射时按剂量需要用混合油稀释, 中剂量组按美国 NAS-NRC 推荐的大鼠核黄素需要量, 90 天所需长效核黄素单酯为 5.01mg, 低、高剂量组分别减半和加倍; 核黄素组动物注射核黄素油混液, 由核黄素加混合油于玛瑙研磨中而成, 剂量与长效核黄素单酯中剂量组相当, 核黄素缺乏组动物注射等体积混合油, 试验结果如下图。

从图中可以看出, 长效核黄素能促进大鼠体重的增长, 优于普通核黄素, 作用时间达 3 个月。

实施例 6: 长效核黄素对儿童白血病化疗后口腔溃疡的预防作用

采用 1994 年以来住院病例 48 例, 其中男性 32 例, 女 16 例, 年龄 3-11 岁。急性淋巴白血病 35 例, 急性非淋巴白血病 13 例, 其中 M_2 6 例, M_3 3 例, M_4 2 例, M_5 2 例。采用正规方的化疗方法, 如 CODPL, HDMTX, DA, 其它方案未统计。HDMTX 采用四

□, 部分病例治疗前使用长效核黄素 150mg, 肌注 1 次。

表长效核黄素化疗后口腔溃疡的预防作用

组别		化疗 人次	溃疡 次数	发生 率(%)
ALL	未使用长效核黄素	124	32	25.8
	化疗前用长效核黄素	18	0	0
	3 月内用过长效核黄素	42	3	7.1
ANLL	未使用长效核黄素	28	8	28.6
	化疗前用长效核黄素	8	0	0
	3 月内用过长效核黄素	8	1	12.5

表中结果说明, 化疗前使用长效核黄素, 可有效地预防口腔溃疡的发生, 使用长效核黄素不当 3 个月内, 能降低化疗后口腔溃疡的发生率。

实施例 7: 长效核黄素预防白血病骨髓移植化疗粘膜炎

解放军 307 医院对 28 例血病骨髓移植病人, 肌注长效核黄素 150mg 以预防粘膜炎。其中仅 4 例 (14.3%) 发生口腔溃疡, 而未用长效核黄素的 6 例病人中有 4 例 (66.7%) 发生严重的口腔溃疡, 其中 1 例发展为全牙周组织坏死。

实施例 8: 长效核黄素治疗顽固性口腔溃疡

张某, 男性, 35 岁。1984 年起, 发现口腔出现大小不等的溃疡数处, 经当地医院诊断为“复发性口疮”。口服核黄素及局部贴敷溃疡药膜, 但此病迁延不愈, 溃疡次愈彼起。其间歇期为 4 个月左右, 劳累后为剧。1995 年后服用一定疗程的中成药, 间歇期有所延长, 但劳累后仍有复发。溃疡数目一般为 3-4 个, 部位不定。自 1999 年注射长效核黄素油混悬制剂后, 虽有时工作劳累, 睡眠不足, 但至今未复发。

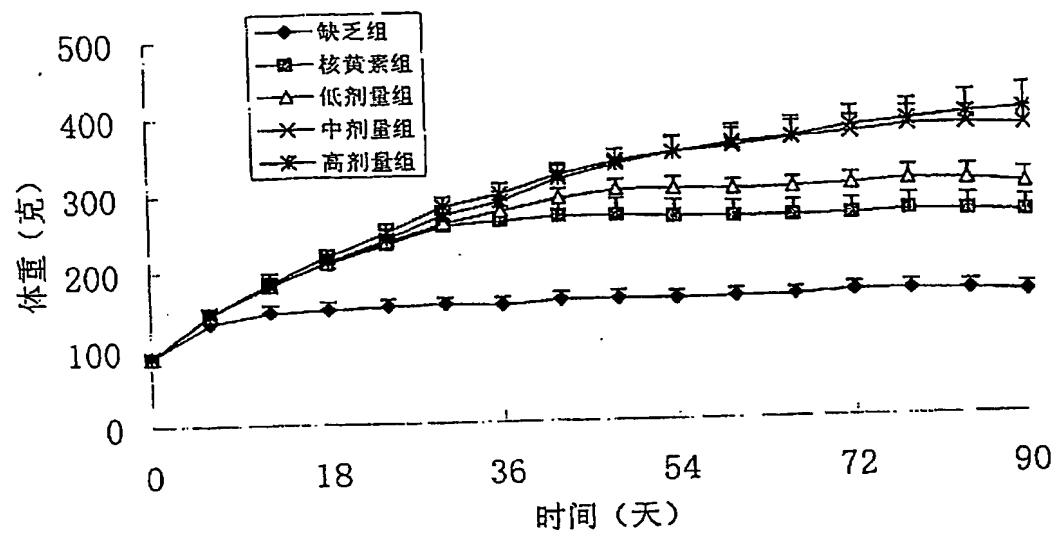


图 1